

10/522 268  
PCT/11 037 004 40  
Mod. C.E. 1-4-7  
Rec'd PCT/PTO 25 JAN 2005 #2

# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 08 SEP 2003	
WIPO	PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. **RM2002 A 000402**



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

Roma, 11. 1 AGO. 2003

per IL DIRIGENTE

*Paolo Giuliano*

*Diretta Paolo Giuliano*

**BEST AVAILABLE COPY**

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

## AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

marca  
da  
bollo

## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A. N.G. SP  
Residenza Roma (RM) codice \_\_\_\_\_  
2) Denominazione \_\_\_\_\_  
Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dott. Marco Spadaro ed altri cod. fiscale \_\_\_\_\_  
denominazione studio di appartenenza Studio Associato CAVATTONI - RAIMONDI  
via le dei Parioli n. 160 città Roma cap 00197 (prov) RM

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

## D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci) \_\_\_\_\_

gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

"Derivati fluoro-alchil-ciclopeptidi ad attività anti-integrine"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) Alma DAL POZZO 3) Claudio PISANO  
2) Giuseppe GIANNINI 4) \_\_\_\_\_

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIoglimento RISERVE Data N° Protocollo
nessuna					

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc.	N. es.	PROV	n. pag.	n. tav.	RIS	DESCRIZIONE
1)	29	PROV	29			riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
2)	0	PROV				disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
3)	1	RIS				lettera d'incarico, procure o riferimento-procura generale
4)	0	RIS				designazione inventore
5)	0	RIS				documenti di priorità con traduzione in italiano
6)	0	RIS				autorizzazione o atto di cessione
7)	0					nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale euro Duecentonovantuno/80.- obbligatorio

COMPILATO IL 29/07/2002 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I) Marco SPADARO

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

CAMERA DI COMMERCIO, INDUSTRIA, ARTIGIANATO E AGRICOLTURA - ROMA codice 58

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA RM 2002 A 000402

L'anno duemiladue, il giorno ventinove, del mese di luglio

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 10/01 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

L'Ufficiale Rogante  
Silvia Altieri

## RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO

29/07/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ / /

RM 2002 A 000402

## D. TITOLO

"Derivati fluoro-alchil-ciclopeptidi ad attività anti-integrine"

## L. RIASSUNTO

## Composti di formula (I)

 $\text{ciclo}[\text{NX}_1\text{-R}_1\text{-CO-NX}_2\text{-R}_2\text{-CO-NX}_3\text{-R}_3\text{-CO-NX}_4\text{-R}_4\text{-CO-NX}_5\text{-R}_5\text{-CO}]$ ,

dove i significati dei vari gruppi sono come descritti di seguito, sono inibitori delle integrine, in particolare della famiglia  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ , quindi sono utili come medicinali, in particolare per il trattamento di patologie sottostanti un'alterata angiogenesi, quali retinopatia, insufficienza renale acuta, osteoporosi e metastasi. I composti qui descritti sono anche utili come mezzi diagnostici, una volta opportunamente marcati, in special modo per la rivelazione di piccole masse tumorali e eventi di occlusione arteriosa.

## M. DISEGNO



Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"Derivati fluoro-alchil-ciclopeptidi ad attività anti-integrine"

a nome: SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

di nazionalità: italiana

con sede in: Viale Shakespeare, 47 - 00144 Roma RM

Inventori: DAL POZZO Alma

GIANNINI Giuseppe

PISANO Claudio

La presente invenzione si riferisce a derivati fluoro-alchil-ciclopeptidici ad attività anti-integrine, in particolare a composti peptidi ciclici contenenti gruppi fluoro-alchilici sull'azoto del legame peptidico e/o in posizione C- $\alpha$ , come indicato nella Formula (I) sottostante. La presente invenzione si riferisce anche a procedimenti per la preparazione di detti composti, al loro uso come medicamenti, in particolare come inibitori dei recettori delle integrine, utili come antiangiogenici e antimetastatici e a composizioni farmaceutiche che li contengono.

#### Sfondo dell'invenzione

Le integrine sono una classe di recettori coinvolti nel fenomeno dell'adesione cellulare. Sono glicoproteine costituite da due subunità  $\alpha$  e  $\beta$ , combinate fra loro a dare differenti famiglie. Per un maggiore approfondimento, si veda *Kessler, H. e al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1997, 36, 1374-89.*

Molte integrine hanno un "sito di riconoscimento cellulare in grado di riconoscere la comune sequenza peptidica Arg-Gly-Asp,

nota anche come RGD, dai simboli a una lettera che identificano i tre amminoacidi, anche se ogni integrina riconosce preferenzialmente una diversa conformazione di questo tripeptide (Kessler, H. e al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 7461-72).

La famiglia delle integrine  $\beta_1$  gioca un ruolo importante nell'organizzazione dei tessuti, le  $\beta_2$  sono importanti per il sistema immunitario, mentre le  $\beta_3$  regolano il processo coagulativo e l'angiogenesi.

Un obiettivo della chimica farmaceutica è mettere a disposizione del medico composti che possano interagire con la famiglia delle integrine, ma in modo selettivo nei confronti dei diversi sottotipi, vista la diversità di ruoli che ciascuno di essi riveste a livello fisiopatologico.

La presente invenzione è diretta alle integrine coinvolte nei meccanismi dell'angiogenesi.

L'azione di differenti fattori di crescita stimola l'espressione della integrina  $\alpha_v\beta_3$  (recettore vitronectina) sulle cellule endoteliali. Durante la conseguente migrazione delle cellule endoteliali nella direzione della stimolazione dell'angiogenesi, la membrana con il recettore integrina  $\alpha_v\beta_3$  lega la sequenza tripeptidica RGD presente nelle varie forme sulla matrice extracellulare. Tale legame porta a un accumulo di proteine - di tipo talina, paxilina,  $\alpha$ -actinina, tensina, vinculina - del citoscheletro. Questo favorisce il processo di migrazione, agendo come segnale di sopravvivenza delle cellule endoteliali, con la formazione di nuovi vasi sanguigni. La

somministrazione di analoghi RGD solubili impedisce l'accumulo di proteine sui recettori e porta alla morte programmata (apoptosi), sfavorendo la migrazione della cellule endoteliali e prevenendo la neovascolarizzazione (Giannis, A. e al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1997, 36, 588-90).

Fra le tante molecole selettivamente coinvolte nell'angiogenesi, le integrine rappresentano un interessante bersaglio nella terapia antitumorale e in tutte quelle patologie sottostanti una neovascolarizzazione incontrollata.

Un primo lavoro scientifico sull'argomento (Saiki, I. e al. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1990, 81:668-675) riporta l'azione di peptidi contenenti una sequenza RGD che riconosce l'integrina, inibendo così l'angiogenesi nei tumori.

Il tripeptide RGD è presente nei ligandi naturali di questi recettori, come vitronectina, fibronectina e fibrinogeno.

Studi più recenti hanno mostrato che le integrine tipo  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  aumentano nell'angiogenesi dei tumori delle cellule endoteliali e che l'inibizione di integrine  $\alpha_v$  mediante anticorpi, peptidi ciclici RGD e peptidomimetici RGD, possono bloccare la neovascolarizzazione (Arap, W. e al. *Current Opinion in Oncology*, 1998, 10:560-565). Anche le integrine  $\beta_1$  ( $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_1$ ) possono giocare un ruolo nell'angiogenesi anche se tuttora il loro ruolo non è stato ancora ben studiato.

La somministrazione sistemica di un anticorpo anti- $\alpha_v\beta_3$ , ad esempio l'anticorpo LM609 (Vitaxin), blocca l'angiogenesi tumorale

e riduce la crescita e le proprietà invasive del carcinoma mammario umano (Brooks, P.C. e al., *J. Clin. Invest.*, 1995, 96:1815-22).

Molte integrine possono essere inibite da piccoli peptidi che incorporano la sequenza RGD. L'incorporazione di questa sequenza in cicli penta- o esapeptidi contenenti D-amminoacidi porta solitamente a molecole che sono potenti e selettivi inibitori delle integrine (Haubneuv, R. e al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118:7881-91).

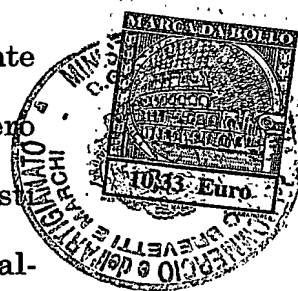
La vitronectina è una proteina della matrice vascolare ed è un antagonista selettivo dei recettori  $\alpha_v\beta_3$ , mentre il fibrinogeno, un'altra proteina, presenta un legame selettivo con i recettori  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .

Finora la ricerca di analoghi RGD è stata prevalentemente indirizzata verso antagonisti dei recettori del tipo  $\alpha_{IIb}\beta_3$  che fossero potenti, selettivi e somministrabili per via orale. Alcuni di questi non-peptidi RGD analoghi, usati come anticoagulanti, sono attualmente in sperimentazione clinica.

Come antiangiogenici, occorrono invece analoghi RGD capaci di inibire selettivamente i recettori  $\alpha_v\beta_3$  e/o  $\alpha_v\beta_5$  senza influire sui recettori  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .

Per quanto riguarda esempi di composti inibitori dei recettori  $\alpha_v\beta_3$  e le relative applicazioni, si veda EP 1 077 218, a nome della richiedente, al quale si fa esplicito riferimento anche per ulteriore discussione sulla tecnica nota.

Esempi di strutture peptidiche cicliche contenenti la sequenza Arg-Gly-Asp (RGD) sono descritti in EP 596350, Merck



Patent; *Wermuth, J. e al., J. Am. Chem. Soc., 1997, 119(6), 1328-1335*; US 5.705481, Merck Patent; WO 99/58162, Du Pont Pharmaceuticals; *Liu, S. e al., Bioconjugate Chemistry (2001), 12(4), 559-568*; WO 01/097860.

Uno degli scopi della presente invenzione è di fornire antagonisti selettivi per i recettori  $\alpha_v\beta_3$  che siano somministrabili per via orale, caratteristica utile per le terapie di lungo periodo.

Sono rari gli esempi di composti organici naturali contenenti un atomo di fluoro. Questo elemento, grazie alle sue proprietà chimico-fisiche (dimensioni, elettronegatività, ecc.), può conferire ai composti organici biologicamente attivi delle caratteristiche peculiari.

Negli ultimi anni, con la disponibilità di reattivi fluoruranti più maneggevoli, sono stati preparati derivati organici con interessanti caratteristiche, ad esempio: amminoacidi substrati di enzimi piridossal-dipendenti (transaminasi e decarbossilasi) si comportano da inattivatori specifici quando vengono fluorurati; pirimidine fluorurate hanno attività antitumorale; analoghi del Captopril trifluorometilati hanno attività inferiore al nM; analoghi fluorurati delle antracicline naturali sono molto più attivi come antitumorali (*Giannini, G., Current Medicinal Chem., 2002, 9:1867-93*); gli analoghi trifluorometilati delle encefaline hanno aumentato la loro potenza fino a 10.000 volte. Analoghi fluorurati lineari di RGD sono descritti in *A. Dal Pozzo e al., J. Chem. Res. (S) 468-469 (1999)*. Si veda anche *Ojima I., Organofluorine Compounds in*



*Medicinal Chemistry and Biomedical Applications*; R. Filler (eds), 1993 - Elsevier Science Publisher; Ojima I. e al., *Biomedical Frontiers of Fluorine Chemistry - ACS Symposium Series 639* (1996); Sewald N. e al., *Amino Acids* (1995) 8:187-194;

L'alchilazione di un amminoacido rappresenta un aspetto molto importante nella chimica farmaceutica. Anche nel campo degli inibitori delle integrine ci sono esempi di N-alchilazione degli amminoacidi (Kessler, H. e al., *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 3033-40), che hanno portato al prodotto denominato EMD121874 (Cilengitide), sviluppato dalla Merck e attualmente in fase II della sperimentazione clinica.

Molto meno frequente è l'approccio dell' $\alpha$ -alchilazione, sebbene anche questo rimanga un approccio potenzialmente interessante. È infatti noto che l'incorporazione di amminoacidi C $^{\alpha}$ -disostituiti in posizioni chiave di peptidi può modificare e stabilizzare la struttura secondaria (Marshall, G.R., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1998, 32, 544-5). Inoltre, la sostituzione dell'idrogeno con il fluoro può influenzare la solubilità e la stabilità proteolitica del peptide che lo contiene (Koksch, B., *J. Pept. Sci.*, 1997, 3, 157-67).

Lo stadio successivo all'alchilazione è la fluoroalchilazione degli amminoacidi. Anche in questo caso, ci sono degli esempi di fluoroalchilazione di oligopeptidi lineari (Dal Pozzo A., e al. *Tetrahedron*, 1998, 54: 6019-28; Koksch, B. e al. *Biomedical Frontiers of Fluorine Chemistry*; ACS Symposium Series 639, Chapter 3, 1996, 42-58). I peptidi fluoroalchilati presentano i seguenti vantaggi:

protezione delle peptidasi fisiologiche, analogamente all'alchile; notevole aumento del carattere idrofobico (superiore alla maggior parte dei gruppi alchilici), che aumenta la biodisponibilità (assorbimento e distribuzione); irrigidimento della conformazione, dovuto all'ingombro (che in soluzione è maggiore di quello di un semplice gruppo metilico), alla capacità unica di dare legami idrogeno, che può provocare, tra l'altro, una ristretta rotazione attorno al legame carbamidico.

Un altro scopo della presente invenzione è fornire un procedimento di sintesi di peptidi contenenti in posizione chiave amminoacidi fluoroalchilati in posizione C- $\alpha$  e/o N- e, nonostante l'ingombro sterico e gli effetti elettronici delle nuove strutture prodotte, la scoperta delle proprietà biologiche di questi composti, quali potenti inibitori selettivi delle integrine del tipo recettoriale di  $\alpha_v\beta_3$  e/o  $\alpha_v\beta_5$ .

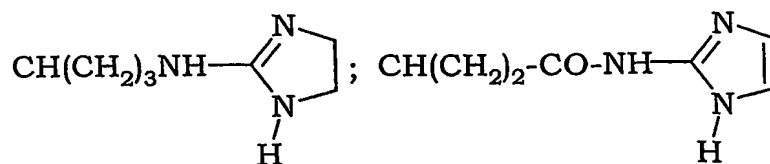
#### Riassunto dell'invenzione

È stato ora trovato che composti di Formula (I)  
 ciclo[NX<sub>1</sub>-R<sub>1</sub>-CO-NX<sub>2</sub>-R<sub>2</sub>-CO-NX<sub>3</sub>-R<sub>3</sub>-CO-NX<sub>4</sub>-R<sub>4</sub>-CO-NX<sub>5</sub>-R<sub>5</sub>-CO]

dove:

R<sub>1</sub> è scelto tra:

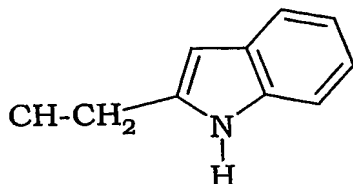
CH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>; C[CH<sub>n</sub>F<sub>m</sub>](CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>



R<sub>2</sub> è il gruppo CH<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>;

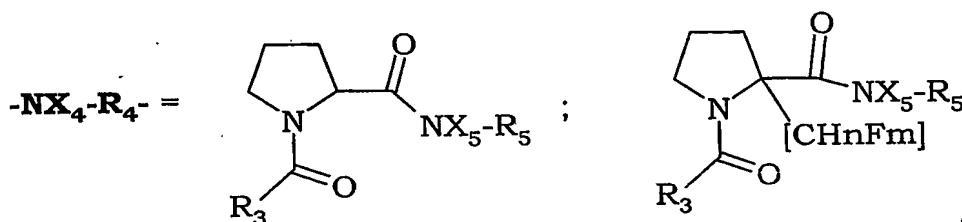
R<sub>3</sub> è scelto tra CHCH<sub>2</sub>COOH; C[CH<sub>n</sub>F<sub>m</sub>]CH<sub>2</sub>-COOH;

$R_4$  è scelto tra  $\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$ ;  $\text{C}[\text{CH}_n\text{F}_m]\text{CH}_2\text{-Ph}$ ;  $\text{CH-CH}_2\text{-(4-OH)Ph}$ ;  $\text{CH-CH}_2\text{-(4-OMe)Ph}$ ;  $\text{CH-CH}_2\text{-(4-F)Ph}$ ;  $\text{CH-CH(OH)-Ph}$ ;  $\text{C(CH}_3)_2$ ;  $\text{CH-C(CH}_3)_3$ ;  $\text{CH-CH}_2\text{-COOH}$ ;



$R_5$  è scelto tra  $\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$ ;  $\text{C}[\text{CH}_n\text{F}_m]\text{CH}_2\text{-Ph}$ ;  $\text{CH-CH(CH}_3)_2$ ;  $\text{C}[\text{CH}_n\text{F}_m]\text{CH(CH}_3)_2$ ;  $\text{CH-C(CH}_3)_2$ ;

oppure, il gruppo  $\text{NX}_4\text{-R}_4\text{-CO-NX}_5\text{-R}_5\text{-CO}$  è 3-Aminometilbenzoile



$$n + m = 3$$

$\text{X}_1\text{-X}_5$  uguali o diversi fra loro sono  $\text{H}$ ,  $(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_3$ ;  $(\text{CH}_2)_n\text{-CHF}_2$ ;  $(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{F}$ ,  $(\text{CH}_2)_n\text{-CF}_3$  dove  $n = 0-3$ ;

con la condizione che nel composto di formula (I) vi sia presente almeno un amminoacido  $\alpha$ -fluoroalchilato.

dove ciascun amminoacido  $\text{NX-R-CO}$  può avere configurazione assoluta di tipo R o di tipo S; i loro singoli enantiomeri, diastereoisomeri, le relative miscele, i sali farmaceuticamente accettabili sono inibitori selettivi dei recettori delle integrine  $\alpha_v\beta_3$  e/o  $\alpha_v\beta_5$ .

Pertanto, sono un oggetto della presente invenzione, composti di Formula (I), come sopra riportato, procedimento per la loro



preparazione, il loro uso come medicamenti e composizioni farmaceutiche che li contengono.

Questi e altri oggetti della presente invenzione, saranno illustrati in dettaglio anche per mezzo di esempi.

#### Descrizione dettagliata dell'invenzione

Secondo la presente invenzione, sali farmaceuticamente accettabili sono tutti quei sali che l'esperto del settore sarà in grado di preparare, senza che l'acido o la base utilizzata diano luogo a effetti indesiderati, quando detti sali sono impiegati come medicamenti.

Nell'ambito della presente invenzione, sono preferiti i seguenti composti:

c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(R o S)-Tfm-Phe) (ST1930/ST1931);

c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(R,S)-Dfm-Phe) (ST1932);

c(Arg-Gly-Asp-(R o S)-Tfm-Phe-Asp-D-Phe-Val)  
(ST2189/2190);

c(Arg-Gly-Asp-(R o S)-Tfm-Phe-Val) (ST2191/2192);

c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(R o S)-Tfm-Val) (ST2409/ST2410);

c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(R o S)-N-Me-Tfm-Phe.

Nel suo aspetto più ampio, la presente invenzione fornisce un metodo per inibire selettivamente l'adesione cellulare mediata dalle integrine  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  a un ligando contenente la sequenza RGD. In un altro suo aspetto, la presente invenzione ha per oggetto l'uso di un composto di formula (I) per la preparazione di un medicamento utile per trattare un soggetto affetto da

un'alterata angiogenesi. Esempi di utilizzo del medicamento secondo l'invenzione sono la riduzione delle metastasi, il trattamento della retinopatia, l'insufficienza re-nale acuta, l'osteoporosi.

In un altro suo aspetto, la presente invenzione ha per oggetto i composti sopra descritti come mezzi diagnostici. In particolare, i composti secondo la presente invenzione, una volta opportunamente marcati, sono utili per la localizzazione di piccole masse tumorali. In maniera analoga, detti composti marcati sono anche utili per l'analisi di eventi di occlusione arteriosa, del tipo ictus o infarto del miocardio. Pertanto, è un ulteriore oggetto della presente invenzione l'uso di composti di formula (I), come sopra riportato per la preparazione di mezzi diagnostici, in particolare per la localizzazione di tumori, preferibilmente piccole masse tumorali, oppure di eventi di occlusione arteriosa, quali ictus e infarto del miocardio. Rientrano nella presente invenzione anche i mezzi diagnostici che comprendono almeno un composto di formula (I). Per quanto riguarda la marcatura dei composti della presente invenzione, questa è alla portata del tecnico medio del ramo, il quale ricorrendo alle proprie conoscenze generali, è in grado di scegliere l'opportuno marcatore e di derivatizzare il composto dell'invenzione. Un esempio di applicazione per i composti della presente invenzione può essere visto in WO 99/11590 e nei seguenti riferimenti: *Su Z.F, et al., Bioconjug Chem. 2002 May-Jun;13(3):561-70; Haubner R, et al., Cancer Res. 2001 Mar*

1;61(5):1781-5; Haubner R, et al., *J Nucl Med.* 2001 Feb;42(2):326-36; van Hagen P.M, et al., *Int J Cancer.* 2000 Aug 20;90(4):186-98; Sivolapenko G.B, et al., *Eur J Nucl Med.* 1998 Oct;25(10):1383-9; Pearson D.A, et al., *J Med Chem.* 1996 Mar 29;39(7):1372-82..

Dal punto di vista chimico, la presente invenzione consiste nell'ottenere derivati a struttura peptidica, ciclizzati, che comprendono alcuni amminoacidi non naturali (fluoroalchil-amminoacidi) la cui sintesi è già nota o è stata studiata opportunamente.

I ciclopeptidi sono stati sintetizzati a partire da un amminoacido fluorometilato sotto forma di estere carbossilico; questo viene acilato col bromuro dell'amminoacido corrispondente N-protetto. Dopo idrolisi del dipeptide estere così ottenuto, si condensa il carbossile terminale con H-Orn(Cbz)-Gly-OtBu.

Dopo aver eliminato la protezione dell'azoto terminale dal tetrapeptide così ottenuto, questo viene acilato con Fmoc-Allygly-OH (precursore dell'acido aspartico) per dare il pentapeptide lineare totalmente protetto. Dopo deprotezione dei due gruppi protettivi terminali, si procede alla ciclizzazione via TBTU, seguita dall'ossidazione del residuo allilico con permanganato. Gli ultimi passaggi prevedono lo sblocco del Cbz sulla catena laterale dell'ornitina, seguito da guanidilazione della funzione amminica, per ottenere il ciclopeptide finale, che viene purificato in RP-HPLC, con separazione dei due diastereoisomeri.

Di seguito vengono riportate 3 preparazioni esemplificative sulla sintesi degli amminoacidi (building block) fluorurati:

PREPARAZIONE 1H-(R,S)- $\alpha$ -Tfm-Phe-OEt

(Burger, K., Gaa, K., *Chemiker Zeitung*, 1990, 114, 101-104)

Il prodotto è stato preparato come descritto nel riferimento sopra citato.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,33-7,18 (m, 5H, arom.), 4,26 (q,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3,45-2,95 (dd,  $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$ ), 1,32 (t,  $\text{CH}_3$ ).

PREPARAZIONE 2H-(R,S)- $\alpha$ -Dfm-Phe-OEt

(Bey, P., Vever, J.P., Van Dorsselaer, V. e Kolb, M., *J. Org. Chem.* 1979, 44, 2732-42)

Il prodotto è stato preparato come descritto nel riferimento sopra citato.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,28-7,13 (m, 5H, arom.), 6,14-5,77 (t,  $\text{CHF}_2$ ), 4,16 (q,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3,20-2,87 (2 dd,  $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$ ), 1,21 (t,  $\text{CH}_3$ ).

PREPARAZIONE 3N- $\text{CH}_3$ -(R,S)- $\alpha$ -Tfm-Phe-OCH $_3$ 

(Burger, K. e Hollweier, W., *Synlett*. 1994, 751-3)

Il prodotto è stato preparato come descritto nel riferimento sopra citato.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,28-7,15 (m, 5H, arom.), 3,73 (s,  $\text{OCH}_3$ ), 3,27, 3,22, 3,16, 3,12 (q,  $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$ ), 2,47 (s,  $\text{N-CH}_3$ ).



Questi blocchi sintetici ("building blocks") sono utilizzati per la sintesi dei ciclopeptidi secondo la presente invenzione, utilizzando tecniche note al tecnico di ordinaria esperienza nel settore.

I seguenti Esempi illustrano ulteriormente l'invenzione.

Abbreviazioni: TEA: Trietilammina; THF: Tetraidrofurano; LDA: Litioisopropilammide; DMF: Dimetilformammide; Bromoenammina: 1-Bromo-N,N-2-trimetil-1-propenilammina; HATU: O-(7-Azabenzotriazolo-1-il)-N,N,N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>-tetrametiluronio esafluorofosfato; DIEA: Diisopropilammina; DCM: diclorometano; DCC: dicicloesilcarbodiimmide; HOAT: Azabenzotriazolo; allgly: 2-Alilglicina; Tfm: Trifluorometil-; Dfm: Difluorometil-; TBTU: O-(benzotriazolo-1-il)N,N,N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>-tetrametiluronio tetrafluoroborato

### ESEMPIO 1

#### C(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(R o S)-Tfm-Phe) (ST1930/ST1931)

Preparazione di Pht-D-Phe-Br (*Dal Pozzo, A. Bergonzi, R., e Ni, M.H., Tetrahedron Lett., 2001, 42, 3925-7.*)

1,4 g (4,75 mmoli) di Pht-D-Phe-OH vengono sciolti sotto Argon in 19 ml di una soluzione 0,5 M di Bromoenammina in DCM. Dopo 10 minuti la soluzione è pronta per l'uso.

A 12,5 ml della soluzione del bromuro (preparata come descritto sopra) raffreddata a 0°C, si aggiungono 248 mg (0,959 mmoli) di H- $\alpha$ -Tfm-Phe-Oet e collidina (1 eq.); si agita a temperatura ambiente (t.a.) e dopo 10 minuti si aggiungono altri 6,5 ml della soluzione di bromuro e 1 eq. di collidina. Dopo 2 ore, si porta a secco la miscela e si riprende con 15 ml di NaHCO<sub>3</sub> 5% e 15 ml di



EtOAc, lasciando sotto agitazione per 30 minuti. Si lava il solvente con acqua, HCl 1N e acqua, si evapora e si purifica il residuo su colonna flash, solvente Esano-EtOAc, 8:2.

In una soluzione di 460 mg del dipeptide Pht-D-Phe- $\alpha$ -Tfm-Phe-OEt in 21 ml di DCM anidro, si aggiungono 4,3 ml di una soluzione 1M di BBr<sub>3</sub> in DCM, si scalda a ricadere per 2 ore, poi si lava con 21 ml di acqua e si porta a secco.

390 mg del peptide acido (b) si sciolgono in 6 ml di CH<sub>3</sub>CN anidro con 406,7 (1,4 eq) di HATU e 2,8 eq di DIEA e si lascia 15 minuti sotto agitazione, quindi si aggiungono 548 mg (2 eq) di HCl·H-Orn(Cbz)-OtBu e altri 2 eq di DIEA. Dopo 2 ore si diluisce la reazione con 15 ml di DCM e si estrae con 20 ml di salamoia. La fase organica viene ancora lavata con HCl 2N, NaHCO<sub>3</sub> e acqua. Il residuo viene purificato su colonna flash, solvente Esano-EtOAc, 6:4.

Si sciolgono 424 mg del tripeptide ottenuto sopra in 2,2 ml di TFA/DCM (1:1) e dopo 30 minuti si porta a secco.

Si sciolgono 283,8 mg del composto ottenuto in 5,7 ml di DCM, si aggiungono HCl·H-Gly-OtBu (1 eq), DIEA (2 eq), HOAT (3 eq) e DCC (3 eq). Dopo 20 minuti si filtra la miscela, si lava il filtrato con acqua, HCl 0,1N, NaHCO<sub>3</sub> 5% e acqua, quindi si porta a secco.

349 mg del tetrapeptide ottenuto sopra si sciolgono in 5 ml di EtOH, si aggiungono 600  $\mu$ l di una soluzione 1M di NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, acqua in EtOH (1,5 eq) e si scalda a ricadere per 2,5 ore. Si allon-

tana l'EtOH, si riprende con 10 ml di DCM e 10 ml di una soluzione acquosa contenente 63,6 mg di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1,5 eq). Dopo 10 minuti di agitazione, si porta a secco la fase organica e si purifica il residuo per cromatografia flash con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 98:2.

134 mg del tetrapeptide deprotetto si sciolgono in 2,7 ml di DCM, si aggiungono Fmoc-AllGly-OH (1 eq), DIEA (1 eq), HOAT (1,2 eq) e DCC (1,2 eq) e si procede come descritto sopra.

151,6 mg del pentapeptide ottenuto come sopra si sciolgono in 5 ml di DCM, si aggiungono 140  $\mu\text{l}$  di piperidina. Dopo 2 ore si lava la miscela di reazione con acqua, tampone pH 5,5, acqua,  $\text{NaHCO}_3$  5%, acqua e si porta a secco. Il residuo viene purificato per filtrazione su Silicagel, lavando prima con  $\text{CHCl}_3$ , poi con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH, 95:5.

Il pentapeptide viene deprotetto al carbossile terminale come descritto sopra.

116 mg del pentapeptide lineare deprotetto si sciolgono in 86 ml di DMF, si aggiungono TBTU (3 eq), HOBT (3 eq) e DIEA (860  $\mu\text{l}$ ). Dopo 5 minuti si porta a secco, si riprende il residuo con 10 ml di DCM e si lava la soluzione con salamoia, HCl 2N, acqua,  $\text{NaHCO}_3$  5% e acqua.

80,9 mg del pentapeptide ciclico, ottenuto come sopra, si sciolgono in 6,9 ml di acetone, si raffredda la soluzione e si aggiunge goccia a goccia una soluzione acquosa di  $\text{KMnO}_4$  (100,5 mg in 620  $\mu\text{l}$ ). Dopo 1 ora a  $0^\circ\text{C}$  si lascia a temperatura ambiente per una notte. Alla fine, si aggiungono 770  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3N e una

soluzione di  $\text{NaHSO}_3$  40% fino a completa decolorazione. Dopo aver allontanato l'acetone, si diluisce con acqua e si estrae con EtOAc il prodotto.

66,8 mg del pentapeptide ciclico si sciolgono in 1 ml di una miscela di DMF/AcOH 6:4, si aggiungono 23,8 mg di ammonio formiato (5 eq), quindi 33,4 mg di Pd/C 10%. Dopo 15 minuti si diluisce con MeOH, si filtra su Celite e si porta a secco il filtrato.

60,5 mg del pentapeptide ciclico, totalmente deprotetto, si sciolgono in 540  $\mu\text{l}$  di MeOH, aggiungono 73  $\mu\text{l}$  di DIEA (5 eq) e 49,8 mg di pirazolo-carboxamidina monocloridrato (4 eq). Dopo 1 ora si neutralizza la reazione con TFA e si porta a secco. La purificazione e contemporanea separazione dei 2 diastereoisomeri è stata eseguita in RP-HPLC preparativa alle seguenti condizioni:

Colonna Alltima (Alltech Italia) C18, 10  $\mu\text{m}$ , 250x22 mm;

Fase mobile: Acetonitrile 34% in  $\text{H}_2\text{O}$ +0,1% TFA.

Flusso: 12 ml/min.

I diastereoisomero (Rt 21,30) ST1930

II diastereoisomero (Rt 26,76) ST1931

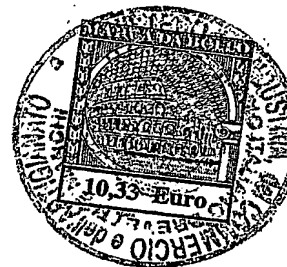
Resa complessiva calcolata sugli ultimi 3 passaggi: 33%.

I diastereoisomero (ST1930)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7,30-7,19 (m, arom.), 4,70, 4,28 e 4,08 (m,  $\alpha\text{-CH}$ ), 3,80-3,15 ( $\text{CH}_2\text{-Gly}$ ), 3,32 (m,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 3,15-2,80 (m  $\text{CH}_2\text{-Asp} + \text{CH}_2\text{-Phe} + \text{CH}_2\text{-Tfm-Phe}$ ), 1,63-1,35 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Arg}$ ).

$^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  5,18.

MS ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 691,13.



## II diastereoisimero (ST1931)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7,23-7,20 (m, arom.), 4,85-4,05 (m,  $\alpha$ -CH), 4,30-3,75 (2 dd  $\text{CH}_2\text{-Gly}$ ), 3,18 (m,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 3,50-2,50 (m  $\text{CH}_2\text{-Asp} + \text{CH}_2\text{-Phe} + \text{CH}_2\text{-Tfm-Phe}$ ), 2,10-1,55 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Arg}$ ).

$^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  4,17.

MS ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 691,13.

ESEMPIO 2c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(R,S)-Dfm-Phe) (ST1932)

A partire da H-(R,S)-Dfm-Phe-OEt, si procede come descritto nell' Esempio 1. Si ottiene una miscela di due diastereoisomeri, che non sono stati separati.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8,00-7,05 (d, NH), 7,35-7,15 (m, arom.), 6,42-5,6 (t,  $\text{CHF}_2$ ), 4,74-4,32 (m,  $\alpha$ -CH), 4,32-3,96 (2 dd,  $\text{CH}_2\text{-Gly}$ ), 3,68-2,50 (m), 1,75-1,45 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Arg}$ ).

$^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  da -54,4 a -55,5.

MS ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 673,14.

ESEMPIO 3c(Arg-Gly-Asp-(R o S)-Tfm-Phe-Asp-D-Phe-Val) (ST2189/2190)

H-(R,S)-Tfm-Allgly-Oet è stato condensato con Pth-Gly-Br, per poi procedere come descritto nell' Esempio 1. La miscela di due diastereoisomeri è stata separata e purificata con HPLC preparativa, con  $\text{CH}_3\text{CN}$  22% in acqua+0,1% TFA.

I diastereoisomero ( $R_t$  20,76)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSOD}_6+\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7,30-7,12, 4,70, 4,26, 4,10 3,86, 3,60-2,70, 1,72, 1,52-1,12, 0,65.

MS (M+H<sup>+</sup>): 643,2.

II diastereoisomero (Rt 25,44)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSOD<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O): δ 7,30-6,96, 4,50, 4,15, 4,10-2,75,  
1,90, 1,62, 1,43-1,20, 0,82.

MS (M+H<sup>+</sup>): 643,2.

#### ESEMPIO 4

c(Arg-Gly-Asp-(R o S)-Tfm-Phe-Val) (ST2191/2192)

H-(R,S)-Tfm-Phe-OEt è stato condensato con Pth-AllGly-Br, per poi procedere come descritto nell'Esempio 1. La miscela di due diastereoisomeri è stata separata e purificata con HPLC preparativa, con CH<sub>3</sub>CN 30% in acqua+0,1% TFA.

I diastereoisomero (Rt 17,19)

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): δ 7,50-7,30, 4,90, 4,30-4,16, 4,05 3,76-3,60,  
3,32-2,82, 2,03-1,70, 1,57, 0,86, 0,73.

MS (M+H<sup>+</sup>): 643,2.

II diastereoisomero (Rt 22,17)

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): δ 7,48-7,12, 4,75, 4,25, 4,07, 3,75-3,10, 2,95,  
2,10, 1,85, 1,63-1,00, 0,77.

MS (M+H<sup>+</sup>): 643,2.

#### ESEMPIO 5

c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(R o S)-Tfm-Val) (ST2409/2410)

HCl·H-(R,S)-Val-Phe-Oet è stato condensato con Pth-D-Phe-Br (trattandosi di cloridrato, sono stati utilizzati 3 eq complessivi di collidina), per poi procedere come descritto nell'Esempio 1. La

miscela finale dei due diastereoisomeri è stata separata mediante cromatografia flash [Esano-AcOEt=4:6].

I diastereoisomero (Fast moving, Rf 0.23)

II diastereoisomero (Slow moving, Rf 0.36).

I due intermedi, chiralmente puri, sono stati trattati separatamente con due sintesi parallele, con passaggi analoghi a quelli descritti nell'Esempio 1.

I Diastereoisomero (ST2409)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.37-7.25; 4.83, 4.73, 4.46, 4.13, 3.47, 3.21, 3.08-2.69, 2.33, 1.92-1.50, 1.08.

$^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  10,50, 0,97

MS ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 643.16

II Diastereoisomero (ST2410)

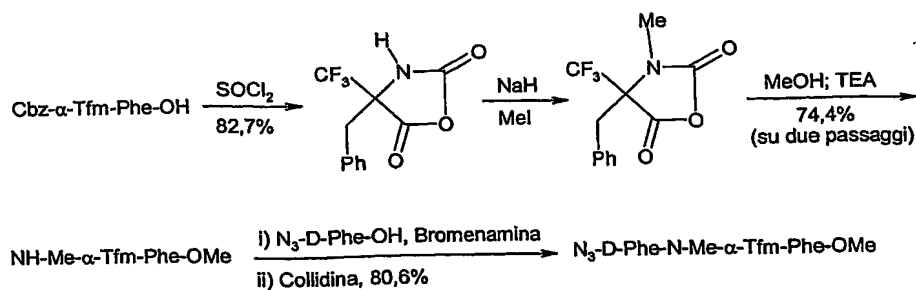
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.37-7.29; 4.87, 4.73, 4.56, 4.46, 3.53, 3.18, 3.00-2.55, 1.87, 1.60, 1.18, 0.85.

$^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  9,29, 0,97

MS ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 643.16

### ESEMPIO 6

c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(R o S)-N-Me-Tfm-Phe)



Dopo idrolisi dell'estere al carbossile terminale, è stato eseguito il coupling con H-Orn(Cbz)-Gly-OtBu; poi il gruppo azido è stato ridotto con  $\text{Ph}_3\text{P}$  e il pentapeptide lineare è stato completato con la condensazione di Fmoc-Allgly all'N- terminale. Da questo intermedio in poi la sintesi del ciclopentapeptide prosegue come descritto nell'Esempio 1.

#### Legame ai recettori dell'integrina $\alpha_v\beta_3$

Piastre da 96 pozzetti vennero sottoposte per una notte a rivestimento con 0,5  $\mu\text{g/ml}$  di integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Chemicon, cat. CC1020). Il giorno successivo, si procedette al lavaggio dei pozzetti e all'incubazione con 0,05 nM di  $(^{125}\text{I})\text{Echistatina}$  (Amersham, cat. IM304) in assenza o in presenza dei composti secondo la presente invenzione. Dopo 3 ore di incubazione e una serie di lavaggi, da ciascun pozzetto venne solubilizzata l'integrina legata al radioattivo con  $\text{NaOH } 2\text{N}$ , quindi si misurò la radioattività con un contatore gamma. Il legame non specifico, da sottrarre a tutti i campioni, venne determinato in presenza di Echistatina 1  $\mu\text{M}$ .

#### Legame ai recettori dell'integrina $\alpha_v\beta_5$

Piastre da 96 pozzetti vennero sottoposte per una notte a rivestimento con 1  $\mu\text{g/ml}$  di integrina  $\alpha_v\beta_5$  (Chemicon, cat. CC1022). Il giorno successivo, si procedette al lavaggio dei pozzetti e all'incubazione con 0,1 nM di  $(^{125}\text{I})\text{Echistatina}$  (Amersham, cat. IM304) in assenza o in presenza dei composti secondo la presente invenzione. Quindi, si procedette come nel caso precedente.

#### Valutazione dei parametri di $\text{IC}_{50}$



L'affinità dei composti secondo la presente invenzione ai recettori della vitronectina venne espressa come valore di  $IC_{50} \pm DS$ , parametro elaborato utilizzando un software "ALLFIT".

La seguente Tabella 1 mostra i risultati ottenuti.

**Tabella 1**

Composto	$IC_{50} \pm DS$ (nM)	
	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_5$
ST1930	345 $\pm$ 86	6,7 $\pm$ 0,8
ST1931	7238 $\pm$ 1283	93 $\pm$ 9
ST1932	332 $\pm$ 101	5,5 $\pm$ 0,8
ST2189	>10.000	>10.000
ST2190	>10.000	>10.000
ST2191	237 $\pm$ 64	10 $\pm$ 1,9
ST2192	1018 $\pm$ 348	72,7 $\pm$ 3,8
ST2409	36,3 $\pm$ 0,84	3,4 $\pm$ 0,07
ST2410	285.3 $\pm$ 8,1	42,8 $\pm$ 0,5

#### Colture cellulari

Le cellule endoteliali microvascolari da surrene bovino (BMEC) vennero isolate da animali appena sacrificati e conservate in ghiaccio fino all'arrivo in laboratorio. In condizioni sterili, le ghiandole vennero lavate in una soluzione di betadine per 5 minuti e successivamente con 2 litri di PBS sterile. Le ghiandole vennero poi tagliate con bisturi monouso sterili in frammenti di circa 2 mm e trasferite in tubi Falcon di polistirene contenenti PBS (30 ml per ghiandola). Dopo centrifugazione a 600 gpm in centrifuga



refrigerata a  $+4^{\circ}\text{C}$ , il surnatante fu decantato. Il centrifugato fu risospeso 1:2 con una soluzione di collagenasi A (Boehringer Mannheim) allo 0,12% e incubato a  $37^{\circ}\text{C}$  per 2 ore sotto agitazione. Dopo filtrazione successiva su filtri (Sigma) prima di 200, poi di 100 mesh, il surnatante venne aggiunto a una soluzione di DMEM 15% FBS per inibire l'azione della collagenasi A. La soluzione venne centrifugata a 1.000 gpm a temperatura ambiente e il precipitato risospeso in terreno DMEM contenente FBS al 20%, 50  $\mu\text{g/ml}$  di estratto cerebrale bovino (BBE), 50  $\mu\text{g/ml}$  di eparina (Sigma), 0,5% v/v gentamicina (Sigma), 1 % v/v di L-glutamina. Le cellule vennero seminate su piastre Petri gelatinizzate con 1% di gelatina (gelatina porcina Sigma). Alla confluenza, le cellule vennero caratterizzate con marcatori endoteliali come il Fattore VIII.

Le cellule di melanoma umano Mewo, provenienti dall'American Type Culture Collection (ATCC) vennero mantenute in coltura in MEM completo contenente FCS al 10%, glutamina 100 unità/ml, amminoacidi non essenziali 1%, gentamicina 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Le cellule di leiomiosarcoma umano SK-LMS-1 (ATCC) vennero cresciute in terreno Eagle Minimal Essential Medium (EMEM) complementato con FCS al 10%, 1mM di amminoacidi non essenziali, 100 unità/ml di gentamicina, 10 mM di L-glutamina e 1mM di sodio piruvato.

Tutte le cellule vennero mantenute a  $37^{\circ}\text{C}$  in atmosfera umidificata contenente  $\text{CO}_2$  al 5%.

### Saggio di adesione cellulare

Piastre da 96 pozzetti furono pretrattate con 5 µg/ml di vitronectina umana (Calbiochem) per 12 ore a +4°C. Le cellule BMEC o le cellule MeWo vennero staccate con tripsina-EDTA, contaminate e piastrate su substrato di vitronectina. Le molecole vennero saggiate a concentrazioni scalari comprese tra 0,1 e 100 µM e incubate con le cellule poste ad aderire. Dopo l'incubazione le cellule vennero lavate una volta con PBS con Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> in modo da rimuovere quelle che avevano aderito al substrato. Le cellule adese vennero fissate con una soluzione di paraformaldeide al 4% per 10 minuti a temperatura ambiente. Le cellule vennero poi colorate con una soluzione di Blu di Toluidina 1% per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo la colorazione, le cellule furono lavate in acqua bidistillata, asciugate e solubilizzate con una soluzione di SDS 1%. Le cellule vennero quindi quantificate mediante lettura in assorbanza al lettore delle piastre Victor multilabel counter (Wallac) a 600 nm.

Il parametro di valutazione dell'attività delle molecole fu il valore IC<sub>50</sub>±DS.

La seguente Tabella 2 mostra i risultati ottenuti.

Tabella 2

Composto	BMEC	MeWo	SK-LMS1
IC <sub>50</sub> ±DS (nM)			
ST1930	8,9±0,4	6,9±1,3 -	



ST1932	14,2±1,0	13,9±4,3	-
ST2191	18,8±4,4	21,9±2,5	-
ST2192	> 100	-	
ST2409	12,5±1,5	-	
ST2410	77,6 ±7.2	-	

In accordo con un altro oggetto della presente invenzione, le composizioni farmaceutiche comprendono almeno un composto di Formula (I) come principio attivo, in una quantità tale da produrre un significativo effetto terapeutico. Le composizioni comprese nella presente invenzione sono del tutto convenzionali e sono ottenute con metodi di comune prassi nell'industria farmaceutica, come ad esempio illustrato in *Remington's Pharmaceutical Science Handbook*, Mack Pub. N.Y. - ultima edizione. A seconda della via di somministrazione scelta, le composizioni saranno in forma solida o liquida, adatte alla via orale, parenterale, endovenosa. Le composizioni secondo la presente invenzione comprendono assieme al principio attivo almeno un veicolo o eccipiente farmaceuticamente accettabile. Possono essere particolarmente utili coadiuvanti di formulazione, ad esempio solubilizzanti, disperdenti, agenti di sospensione, emulsionanti.

RM 2002 A 000402  
RIVENDICAZIONI

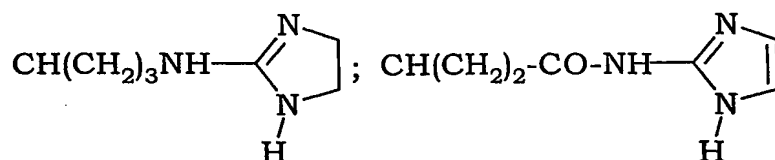
1. Composti di Formula (I)

ciclo[NX<sub>1</sub>-R<sub>1</sub>-CO-NX<sub>2</sub>-R<sub>2</sub>-CO-NX<sub>3</sub>-R<sub>3</sub>-CO-NX<sub>4</sub>-R<sub>4</sub>-CO-NX<sub>5</sub>-R<sub>5</sub>-CO]

dove:

R<sub>1</sub> è scelto tra:

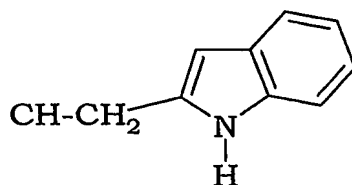
CH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>; C[CH<sub>n</sub>F<sub>m</sub>](CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>



R<sub>2</sub> è il gruppo CH<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>;

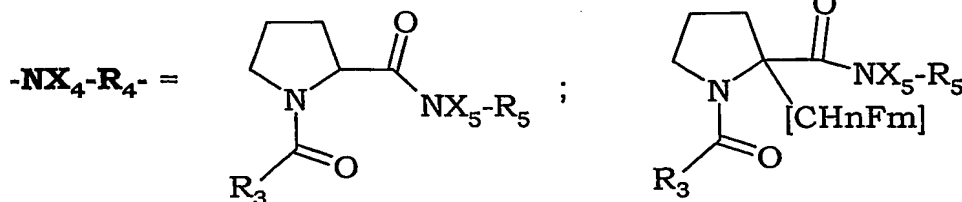
R<sub>3</sub> è scelto tra CHCH<sub>2</sub>COOH; C[CH<sub>n</sub>F<sub>m</sub>]CH<sub>2</sub>-COOH;

R<sub>4</sub> è scelto tra CH-CH<sub>2</sub>-Ph; C[CH<sub>n</sub>F<sub>m</sub>]CH<sub>2</sub>-Ph; CH-CH<sub>2</sub>-(4-OH)Ph; CH-CH<sub>2</sub>-(4-OMe)Ph; CH-CH<sub>2</sub>-(4-F)Ph; CH-CH(OH)-Ph; C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; CH-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; CH-CH<sub>2</sub>-COOH;



R<sub>5</sub> è scelto tra CH-CH<sub>2</sub>-Ph; C[CH<sub>n</sub>F<sub>m</sub>]CH<sub>2</sub>-Ph; CH-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; C[CH<sub>n</sub>F<sub>m</sub>]CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; CH-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;

oppure, il gruppo NX<sub>4</sub>-R<sub>4</sub>-CO-NX<sub>5</sub>-R<sub>5</sub>-CO è 3-Aminometilbenzoile



$$n + m = 3$$

$X_1-X_5$  uguali o diversi fra loro sono H,  $(CH_2)_n-CH_3$ ;  $(CH_2)_n-CHF_2$ ;  $(CH_2)_n-CH_2F$ ,  $(CH_2)_n-CF_3$  dove  $n=0-3$ ;

con la condizione che nel composto di formula (I) vi sia presente almeno un amminoacido  $\alpha$ -fluoroalchilato.

dove ciascun amminoacido  $NX-R-CO$  può avere configurazione assoluta di tipo R o di tipo S; i loro singoli enantiomeri, diastereoisomeri, le relative miscele, i sali farmaceuticamente accettabili.

2. Composto secondo la rivendicazione 1, scelto nel gruppo costituito da:

c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(R o S)-Tfm-Phe);

c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(R,S)-Dfm-Phe);

c(Arg-Gly-Asp-(R o S)-Tfm-Phe-Asp-D-Phe-Val);

c(Arg-Gly-Asp-(R o S)-Tfm-Phe-Val);

c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(R o S)-Tfm-Val)

c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(R o S)-N-Me-Tfm-Phe.

3. Uso dei composti della rivendicazione 1 o 2 come medicamenti.

4. Uso dei composti della rivendicazione 1 o 2 per la preparazione di medicamenti che inibiscono i recettori appartenenti alla famiglia delle integrine appartenenti al sistema  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_6$ .

5. Uso secondo la rivendicazione 4, dove detti medicinali hanno attività antiangiogenica.
6. Uso secondo la rivendicazione 5, dove detti medicinali hanno attività antimetastatica.
7. Uso secondo la rivendicazione 5, dove detti medicinali sono utili per il trattamento di una patologia scelta nel gruppo che comprende retinopatia, insufficienza renale acuta, osteoporosi.
8. Composizioni farmaceutiche comprendenti almeno un composto della rivendicazione 1 o 2 come principio attivo in miscela con veicoli e/o eccipienti farmaceuticamente accettabili.
9. Uso dei composti delle rivendicazioni 1-2 per la preparazione di mezzi diagnostici.
10. Uso secondo la rivendicazione 9, dove detto composto è marcato.
11. Uso secondo la rivendicazione 9 o 10, dove detto mezzo diagnostico è utilizzato per la localizzazione di masse tumorali.
12. Uso secondo la rivendicazione 11, dove dette masse tumorali sono piccole.

13. Uso secondo la rivendicazione 9 o 10, dove detto mezzo diagnostico è utilizzato per la localizzazione eventi di occlusione arteriosa.

14. Uso secondo la rivendicazione 13, dove detto evento è ictus o infarto del miocardio.

15. Mezzo diagnostico comprendente almeno un composto della rivendicazione 1 o 2.

p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.



Dott. Marco Spadaro

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marco Spadaro', written over a horizontal line.

